

B16-02 大気球実験報告：成層圏における微生物捕獲実験 Biopause

大野宗祐^{*1}, 石橋高^{*1}, 三宅範宗^{*1}, 河口優子^{*2}, 梯友哉^{*3}, 奥平修^{*1}, 山田学^{*1}, 山田和彦^{*3},
高橋裕介^{*4}, 原田大樹^{*4}, 山岸明彦^{*2}, 瀬川高弘^{*5}, 野中聡^{*3}, 石川裕子^{*6}, 所源亮^{*7},
山内一也^{*8}, 小林正規^{*1}, 福家英之^{*3}, 吉田哲也^{*3}, 松井孝典^{*1}

A report on the B16-02 balloon experiment: Biopause—bioaerosol sampling at the stratosphere

By

Sohsuke OHNO^{*1}, Ko ISHIBASHI^{*1}, Norimune MIYAKE^{*1}, Yuko KAWAGUCHI^{*2}, Yuya KAKEHASHI^{*3}, Osamu OKUDAIRA^{*1}, Manabu YAMADA^{*1}, Kazuhiko YAMADA^{*3}, Yusuke TAKAHASHI^{*4}, Daiki HARADA^{*4}, Akihiko YAMAGISHI^{*2}, Takahiro SEGAWA^{*5}, Satoshi NONAKA^{*3}, Yuko ISHIKAWA^{*6}, Gensuke TOKORO^{*7}, Kazuya YAMANOUCHI^{*8}, Masanori KOBAYASHI^{*1}, Hideyuki FUKUE^{*3}, Tetsuya YOSHIDA^{*3}, Takafumi MATSUI^{*1}

ABSTRACT

The location of “biopause”, the upper boundary of the biosphere, and the biological flux across the biopause on Earth are the key to understand the universality and distribution as well as the origin and evolution of life in the universe. The most direct information to elucidate the biopause is the distribution and dynamicity of life in the middle atmosphere. We carried out a scientific project named “Biopause” using JAXA’s scientific balloons in order to grasp the dynamics of biological flux in the stratosphere, i.e. the lower middle atmosphere, comprehensively. Our first balloon experiment was conducted on June 8, 2016 and collected aerosol particles in the stratosphere using a newly developed descending inertial impactor. We estimated the number density of the stratospheric microbes including the unculturable ones for the first time in the world. In this paper, we summarize the balloon experiment and the initial results of the sample analysis.

Keywords: biopause, stratospheric aerosol, balloon experiment, extremophile, bioaerosol

概要

地球生命圏の上端 biopause、あるいは地球／地球外間の生命の流入／脱出の有無を確認することは、生命の普遍性や起源、進化、分布を理解する上で非常に重要である。地球／地球外間の生命の流入／脱出の有無を確認する最も直接的な鍵は地球中層大気での生物分布にある。我々は中層大気中での微生物の動態を包括的に理解するため、JAXA（宇宙航空研究開発機構）の大気球を用いた成層圏微生物採取実験（Biopause プロジェクト）を行っている。2016 年度に行った第一回目の大気球実験では、新規開発した降下式インパクト型試料採取装置を用いた、成層圏微粒子の採取に成功した。また、培養できないものも含めた成層圏微生物数密度の上限値を世界で初めて観測することに成功した。本稿では、第一回目の大気球実験の概要と初期分析の結果を報告する。

doi: 10.20637/JAXA-RR-17-007/0002

^{*} 平成 29 年 11 月 21 日受付 (Received November 21, 2017)

^{*1} 千葉工業大学惑星探査研究センター (Planetary Exploration Research Center, Chiba Institute of Technology)

^{*2} 東京薬科大学 (Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences)

^{*3} 宇宙航空研究開発機構 (Japan Aerospace Exploration Agency)

^{*4} 北海道大学 (Hokkaido University)

^{*5} 山梨大学 (University of Yamanashi)

^{*6} リンカーン大学 (University of Lincoln)

^{*7} ISPA (Institute for the Study of Panspermia and Astroeconomics)

^{*8} 東京大学 (University of Tokyo)

1. はじめに

地球大気の下部である対流圏（高度約 10 km まで）には生物が普遍的に存在することが知られている。一方で、熱圏より上（高度約 80 km 以上）の領域では大気密度が低く、微生物が浮遊・滞留することは非常に困難である。これまでに生命の存在が報告された最も高い高度も中層大気（成層圏・中間圏）の領域であり、地球生物圏の上端は中層大気中のどこかに存在すると考えられる。そのため、地球生物圏に明確な境界面が存在するかどうか、存在する場合にはそれを決定するメカニズムは何か、さらには地球生物圏が宇宙に向かって閉じているのか開いているのかを理解する上で、中層大気中の生物の分布と動態が重要な鍵となる。これまでに、大気球あるいはロケットを用いた成層圏での微生物サンプリング実験が行われてきており、成層圏にも生命が存在しているということが報告されている（例えば Yang et al.¹⁾）。また、JAXA 大気球を用いた実験も過去に行われており、平成 16 年、17 年に大気球を用いた微生物採取実験で成層圏での微生物の採取に成功した (Yang et al.²⁾）。

ここで問題となるのは、どのような状態で微生物が成層圏に存在しているかがよくわかっていないことである。生物の地球からの流出 / 地球への流入のフラックスを見積もるためには、中層大気中の微生物の形態・サイズ分布と高度分布を測定し、難培養性微生物を含めた動態を理解する必要がある。

ところが、多くの先行研究では、採取した微生物をまず培養するという分析手順のみが採用されている³⁾。そのため、採取された微生物の状態を観察することが困難であった。培養法では、一個体が単独で浮遊しているのか凝集体でも塵に付着しているのかの区別は難しい。また、難培養性微生物や死んだ微生物も検出できない。一方高度分布に関しても、これまでに報告されている中層大気中の微生物の高度分布は、ロケット⁴⁾、気球^{2,3)}、飛行機実験^{5,6)}などの異なる手法、異なる場所、異なる時期に得られたデータをコンパイルしたものである。同じ手法で系統的に同じ場所における異なる高度の微生物分布を調べた例は存在しない。そのため、それぞれ異なる採取手法や分析手法に起因する採取効率、検出感度、誤差の違い、水平方向の数密度の違い、季節変動などの影響を受けてしまい、鉛直方向の輸送メカニズムや中層大気での滞留時間等を定量的に評価することが出来ない。また、気球実験では、放球前に地上で気球に付着した微生物によるコンタミネーションの可能性があるという指摘もある。

そこで我々は、中層大気中の微生物の形態と高度分布を観測することを目的として、大気球による中層大気中の微生物採取を、コンタミネーションを避ける手法で行い、採取した試料を多角的に分析するプロジェクト「Biopause」を開始した。Biopause プロジェクトの採取試料分析では、先行研究で行われてきた培養法だけでなく、蛍光顕微鏡観察や遺伝子解析を併せて行う。2016 年 6 月に行った我々の第 1 回目の大気球実験では、降下式インパクト型微生物採取装置を用いた試料採取の実証を行うとともに、蛍光顕微鏡と SEM（走査型電子顕微鏡）観察による分析手法を確立した。また、成層圏の難培養性微生物数密度に関する世界初の観測結果を得た。本稿では、その大気球実験の概要と初期分析結果について報告する。

2. 降下式インパクト型試料採取装置

本気球実験では、気球で成層圏まで上昇した後、気球からゴンドラを切り離し、パラシュートで降下している最中に、成層圏中に浮遊する微生物を採取する。降下中に試料を採取することにより、気球をはじめとする実験装置外壁に付着していた微生物（放球前に地上で付着したもの）によるコンタミネーションを防ぐことができる。パラシュートでコントロールされる試料採取中の降下速度が、実験装置外壁に付着していた地上の微生物が離脱した場合の落下速度よりも大きい為、実験装置外壁に付着していた地上の微生物が回り込んで試料採取装置内に入ってくる可能性を非常に小さくすることができる。

降下式インパクト型試料採取装置では、装置の降下により大気を受動的に装置内に取り込み、微生物をインパクションプレート上に採取する。採取機構部の入口と出口にはゲートバルブを設置し、指定したタイミングにより開閉を行い、目的とする高度で試料採取を行う。気球実験用のインパクト型採取装置の概念図を図 1 に示す。円筒状の筒の内部にノズルとインパクションプレートを設置する。インパクションプレートの材質はガラス（蛍光顕微鏡観察用）とモリブデン（SEM 観察用）を用いた。装置下部から取り込まれた大気はノズルを通過後、インパクションプレートを避けるように流れるが、含まれる微粒子はインパクションプレートに衝突し付着する。採取可能な粒子の粒径と採取効率はスロート形状、プレートの大きさ・位置など複数の要

因に依る。本研究では、先行研究 (Marple and Willeke⁷⁾) を参考に、スロート径 (図 1 の w)、スロート最狭部長さ (図 1 の r)、プレートとの距離 (図 1 の s) がそれぞれ等しいという条件の下で最適化を行った。

微生物を効率良く採取するためには、装置内部を大気が効率良く通り抜けることが必要条件となる。そこで、装置内全体の流れ場を知るために、図 1 のような模型を用いた風洞実験と流体計算を行い、比較を行った。我々は風洞実験を、JAXA の惑星環境風洞で行った。大気の流れを知るために、装置の出入り口やノズルのスロート部の静圧を測定したところ、流体計算の結果は風洞実験の結果と良く一致しており、流体計算が風洞実験における流れ場を良く再現していると言える。さらに、流体計算の結果を用いて、微粒子が大気と一緒に採取装置内に取り込まれた場合に試料採取板上に捕集される確率を、粒子計算により見積もった。微生物の大きさは約 $1\ \mu\text{m}$ よりも大きいことが知られており、サイズ $1\ \mu\text{m}$ 以上の微生物の採取ができるよう設計する必要がある。 $1\ \mu\text{m}$ の微粒子は、スロート最狭部の直径を $8\ \text{mm}$ より大きくすると装置内を素通りして採取できない微生物の割合が増えてしまうが、スロート最狭部の直径を $8\ \text{mm}$ より小さくすると装置内を通り抜ける大気量が減少してしまう。そのため本実験では、 $1\ \mu\text{m}$ 粒子の採取確率が約 50% となるスロート最狭部直径、インパクションプレートとの距離が全て $8\ \text{mm}$ となるよう装置を設計し、試験を行った。スロート最狭部の直径が $8\ \text{mm}$ の場合、単独で浮遊している最小サイズの微生物の大きさに相当する直径 $1\ \mu\text{m}$ の粒子が、約 50% の確率で捕集されることが示された。これは、設計通りの値である。最終的には、装置内の流量を稼ぐために、多数のノズルを並列したものとなった。隣り合うノズルどうしの干渉を防ぐためノズル間の距離をノズル最狭部直径の 3 倍以上取るように配置した結果、多数のノズルを並べた実機を用いた風洞実験と単独ノズルを仮定した数値計算とで、粒子の捕集効率は大きく変わらなかった。インパクションプレートの形状を図 2 に、ノズル形状を図 3 に示す。

製作した試料採取装置実機を用いて、風洞を用いた微粒子試料採取の実証試験を行った。JAXA 惑星環境風洞に試料採取装置を設置し、採取装置実機の上流側に蛍光ビーズ (サイズ $1\ \mu\text{m}$ 、 $5\ \mu\text{m}$) の放出機構を設置し、成層圏内でのパラシュートによる降下状態に相当する $0.05\ \text{kPa}$ 、 $30\ \text{m/s}$ における、微粒子捕集の実証実験を行った。図 4 に風洞試験の写真を示す。実験的制約のため捕集確率についての詳細なパラメタスタディは行っていないが、風洞実験において採取装置実機を用いた蛍光ビーズ採取には成功し、数値計算の結果から予測される流量・採取効率と誤差の範囲で一致した。また、微生物のサイズは $1\sim\text{数}\ \mu\text{m}$ 程度と小さいため、分子間力で付着すると非常にはがれにくく、実際に叩く等の衝撃を与えた際もほとんど剥離しなかったことから、捕獲した微生物の捕獲後の落下は限定的であると考えられる。ただし、実際に捕獲された微生物 (後述) の形状は必ずしも球状ではなく、微粒子の採取効率へ与える粒子形状の影響の定量的な見積りは今後の課題である。

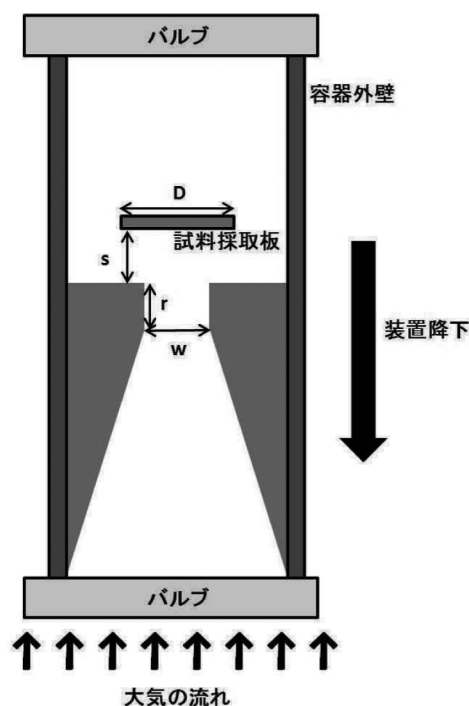


図 1 インパクター型採取装置の概念図。実機では多数のノズルを並列に設置することとした。

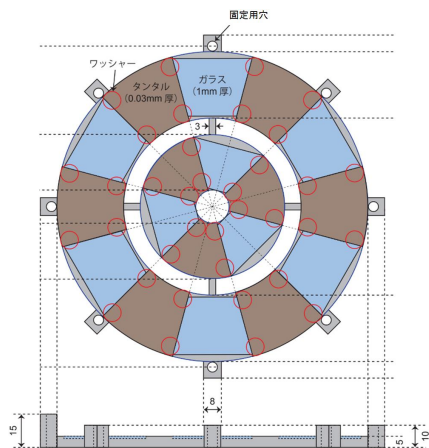


図2 インパクションプレートの図面

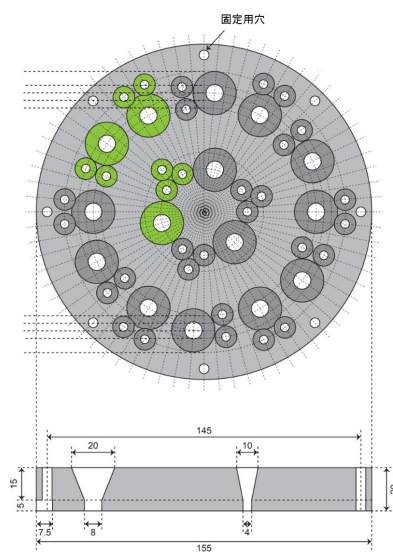


図3 ノズル部の図面

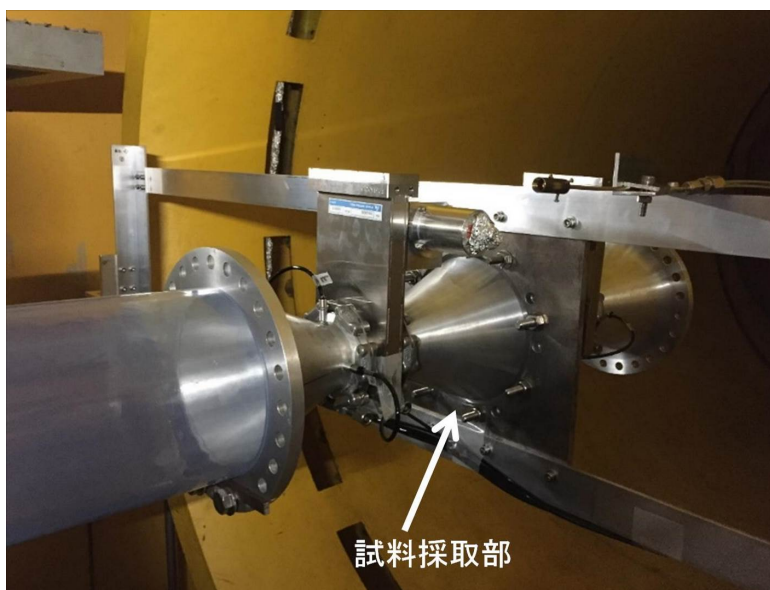


図4 風洞試験の際、風洞内に設置された試料採取部

3. B16-02 大気球実験

2016 年度（6 月、大樹航空宇宙実験場）の B16-02 大気球実験に向け、実験装置一式の準備を行った。気球に吊るすゴンドラに、インパクター型採取装置を試料採取用（S1）とコントロール用（S2; 採取用と同じ準備や分析を行うが、成層圏で採取を行わず、準備や分析の段階でのコンタミネーションの有無を判別する）の 2 セットのほか、流量測定装置（S3）、制御部、バッテリー、ゲートバルブ開閉用高圧ガスタンク、JAXA 大気球実験システム側の装置一式を搭載した。試料採取装置は、内部に塵等が残らないようエタノールや洗剤等を用い繰り返し洗浄した後、全体を乾熱滅菌し、コンタミネーション軽減の為、試料採取部の先端をゴンドラの下部に突き出た形に設置した。そのため、放球直前まで使う為の専用支持台を別途製作し、ゴンドラの下に設置した。ゴンドラの写真を図 5 に示す。試料採取部の先端ノズル部への地上微生物の付着はコンタミネーションの原因になり得るので、放球直前に取り外せる蓋を別途製作し、ノズル部に取り付けた状態で洗浄・滅菌を行った。ゲートバルブは、事前に単独の低温・真空環境下での動作試験を行ったところ、0℃以下では動きが緩慢になり、-50℃では作動しなくなったため、試料採取用試料採取装置（S1）については温調により、5℃以上に保つことにした。

5 月下旬より大樹航空宇宙実験場にて最終準備を行い、実験装置一式を搭載した大気球は 6 月 8 日早朝に大樹航空宇宙実験場から放球された。放球の様子を図 6 に示す。実験装置を搭載した大気球は、予定通り高度 28.5 km まで上昇した。次に、気球の飛翔運用の為、また、上昇時に周囲大気にまき散らされた地上微生物による汚染を避ける為、約 30 分の水平飛行を行った。その後、気球を切り離し、パラシュートによる降下中に試料採取を行った。試料採取装置の入口・出口のゲートバルブは予定通り動作し、高度 27 km から高度 13 km の間で試料採取を行った。採取開始時にゲートバルブを開く際は直接コマンド送信により操作し、採取終了時にゲートバルブを閉じる際は搭載した圧力計によるトリガーで動作させた。その後実験装置一式は回収船によって回収され、密閉されたまま大樹航空宇宙実験場へと輸送された。大気球の飛翔プロファイルを図 7 に示す。

装置一式の回収後、搭載した制御部内に記録されたセンサー出力値やコマンド情報のログファイルの解析を行った。大気球の通信システムを通じリアルタイムで確認していたカメラ映像通り、試料採取部上下のゲートバルブが確かに開閉していたことが確認できた。試料採取部や制御部内等の温度履歴から、ヒーターと保温材の能力が、成層圏環境においてもゲートバルブが動作温度を保つために十分であり、想定していた通りの温調が行われていたことも確認できた。また、圧力計の履歴から、試料採取部の入口・出口ゲートバルブの動力用ガスタンクやガス配管に漏れが無かったことを確認した。装置は、想定通りに動作したことが確認された。



図 5 採取装置一式を搭載したゴンドラ



図 6 平成 28 年度 B16-02 大気球実験の放球の様子

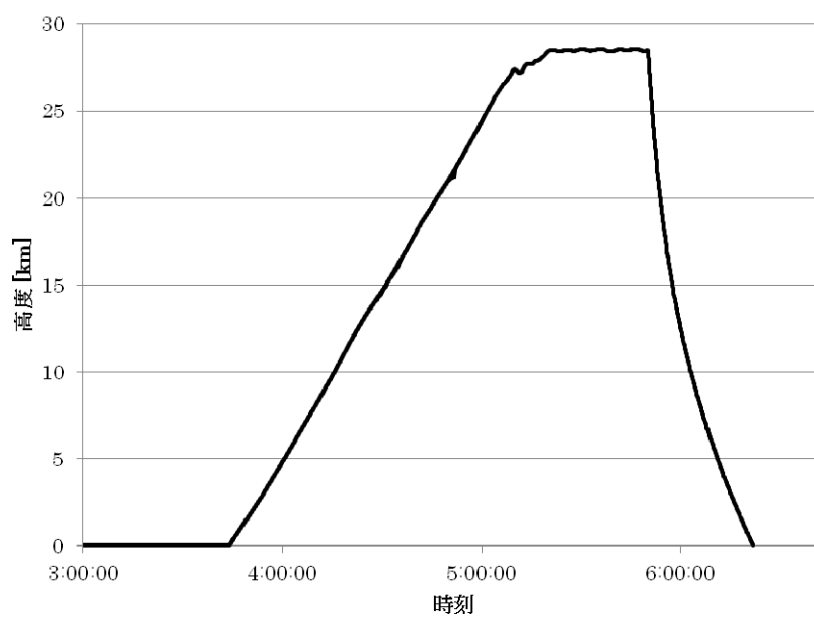


図 7 B16-02 大気球実験の高度プロファイル

4. 採取試料の初期分析

搭載した試料採取装置は、S1 と S2 の 2 組であるが、回収後 S2 内部への浸水が確認された。内部に侵入した水の塩分を塩分計で確認したところ海水の塩分濃度と一致したため、侵入したのは海水であったと考えられる。これは、ゴンドラスペース等の制約のため S2 の保温・温調を行わなかったため、容器を密閉するための O リングの弾性が失われ、上空で容器内圧が低下し、着水後に O リング部分から浸水したためであると考えられる。一方、保温・温調を行った S1 への浸水は確認されなかったため、成層圏で採取された試料は予定通り回収することに成功した。回収されたゴンドラから取り外された試料採取部は、外部を洗浄／殺菌した後、大樹航空宇宙実験場格納庫内の専用作業スペース内部に設置されたクリーンベンチ内にて解体した。その後、蛍光顕微鏡観察用試料は蛍光色素を添加した後カバーガラスで覆い、密閉した。また、SEM 観察用試料は、取り出したクリーンベンチ内にて表面を金蒸着し、密閉容器に保存した。密閉した試料は千葉工大惑星探査研究センターに持ち帰り、それぞれ蛍光顕微鏡と SEM を用いて観察した。

蛍光顕微鏡で観察した結果、放球直前にゴンドラ側面の複数個所に塗布した蛍光ビーズはまったく確認されなかった。これは、ゴンドラに付着した地上微生物の混入は非常に少なかった可能性が高いことを示唆する。また、微生物を含む可能性が高いエアロゾル粒子が合計で 21 個検出された。蛍光色素が小さな石などの微粒子などとも非特異的に結合し光っている可能性も絶対にあり得ないわけではないため、違う色素を用いた染色等のクロスチェックを行える手法を確立していくことが今後の課題である。図 8 に採取部内で確認された粒子の蛍光顕微鏡写真の一例を示す。

21 個という採取微生物数は、今回の試料採取装置の大気通過量と微生物採取効率を用いて換算すると、標準大気 (1 気圧、15°C) 換算で 7×10^1 個 / m^3 の微生物数密度に相当する。気球実験の際に採取部内を通過した空気量は、事前の風洞実験の結果を基に、「採取部入り口の開口部面積を底面積とする高度が 13 km から 27 km の空気柱」の 1/10 の量であるとして見積った。求めた 7×10^1 個 / m^3 という微生物数密度は、難培養性微生物を含めた成層圏微生物数密度の上限値であると考えることができる。浸水のためコントロール試料が失われてしまったので、本実験で検出された 21 個が全て成層圏由来であると断定はできない。しかしながら、万が一 21 個のうちいくつかは地上微生物の混入であった場合でも、検出されたうち成層圏由来の粒子の数が 21 個を超えないことは確かである。そのため、地上微生物の混入量に依らず、本実験で採取された成層圏大気中の平均微生物数密度は、 7×10^1 個 / m^3 を超えない。

一方、SEM 観察の結果、エアロゾルをインパクター型採取装置で採取した場合に特有の「サテライト構造」を持つ微粒子を多数発見した。図 9 に採取された成層圏エアロゾルの SEM 写真の一例を示す。加速されてインパクションプレートに衝突した柔らかい微粒子だけがこのサテライト構造を持ち、放球前や回収後など成層圏での試料採取時以外にインパクションプレートに付着した粒子はこの構造を示さない⁸⁾。すなわち、サテライト構造を持つ粒子の存在は、大気球実験で確かに成層圏微粒子を捕集できた証拠である。現在までに採取板のごく一部しか観察できていないが、46 個のサテライト構造を持つ粒子を発見した。これにより、本実験装置で成層圏において微粒子の採取が行えることが実証された。

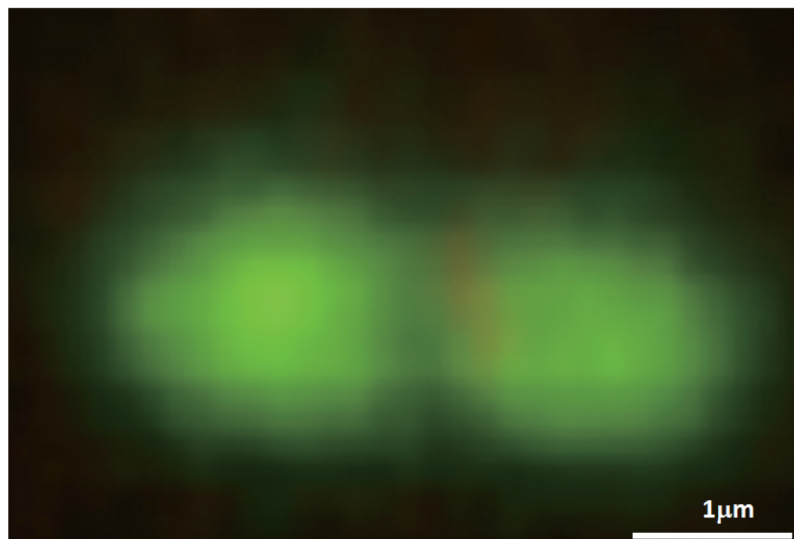


図 8 蛍光顕微鏡画像の一例

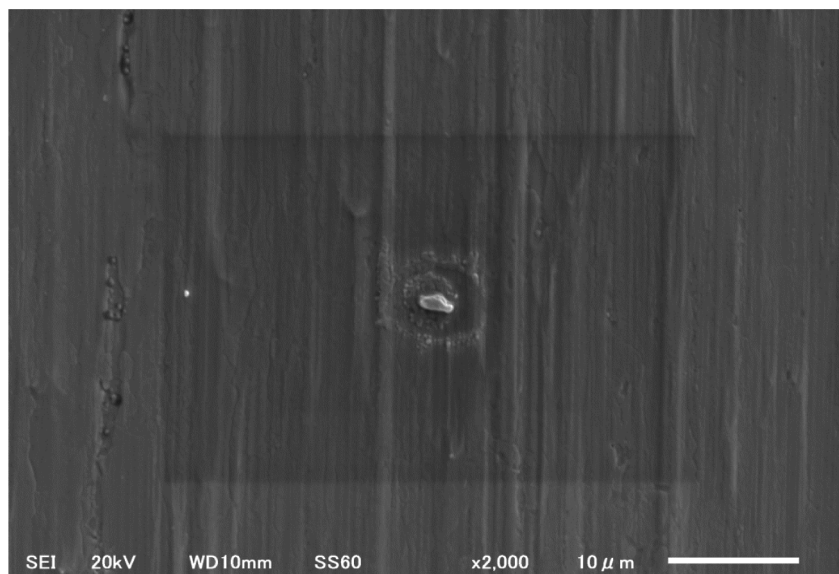


図9 SEM画像の一例

5. B16-02 実験の初期成果のまとめと今後の展望

2016年度に行った大気球実験の結果、新規開発した降下式インパクター型試料採取装置で、成層圏微粒子を採取することに成功した。前述のように、サテライト構造を持つエアロゾル粒子の確認により、確かに成層圏にて微生物試料の採取に成功したことが示された。また、採取装置を搭載したゴンドラの側面に塗布した蛍光ビーズの混入が無かったことから、試料採取中の地上微生物の混入を防止するという降下式インパクター型試料採取装置の最大の長所が実証された。気球実験用の降下式インパクター型の微粒子採取装置による実験は前例がなく、技術実証として重要であるとともに、今後成層圏微生物採取実験を継続していく上での基盤となるものである。

また、本実験の結果より、難培養性微生物も含めた成層圏微生物数密度の上限値を推定した（「4. 採取試料の初期分析」の第三段落参照）。難培養性微生物は自然界の微生物の大半を占めるだけでなく、成層圏微生物の寿命や動態などを理解する上で不可欠な情報を有しており、生物圏界面 *biopause* の検出と理解というプロジェクトの大目標達成へ向けて中核となる観測対象である。これまでの成層圏微生物の観測は培養法に依存しており対象が培養できる微生物のみに限定されていたため、本研究が成層圏の難培養性微生物に関する世界初の観測結果である。

それを踏まえ今後の実験では、まず成層圏微生物の高度分布の観測を行う予定である。同時同地点異高度における成層圏微生物の形状と難培養微生物を含む数密度を観測できれば、成層圏の微生物エアロゾル粒子のサイズと鉛直分布を把握することが可能になり、成層圏生物圏の全体像と成層圏に微生物が存在する理由の理解へ向け、重要なステップとなる。また、2016年度実験で行った蛍光顕微鏡による微生物検出という手法と、先行研究で行われてきた培養法との両方で分析を行いそれぞれの検出効率を求めることで、先行研究で報告されている微生物数密度との比較も可能となる。

謝辞

本大気球実験は、大学共同利用実験として JAXA の提供する大気球による飛行機会を利用して行われました。装置の開発にあたり、日本学術振興会、自然科学研究機構の助成を頂きました。試料採取装置は、ステラ精密株式会社、株式会社ジェック東理社、株式会社フジ・テクノロジー、千葉工業大学工作センターのご協力のもと作製されました。JAXA の皆様をはじめ実験に協力して下さった皆様、装置製作、試料分析にご協力頂いた皆様に感謝いたします。

参考文献

- (1) Yang, Y., Yokobori, S., and Yamagishi, A., Assessing Panspermia Hypothesis by Microorganisms Collected from The High Altitude Atmosphere, *Biological Sciences in Space*, Vol.23 No.3, (2009) 151-163.
- (2) Yang, Y., Itoh, T., Yokobori, S., Shimada, H., Itahashi, S., Satoh, K., Ohba, H., Narumi, I. and Yamagishi, A. *Deinococcus aetherius* sp. nov., isolated from the stratosphere, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, (2009) DOI 10.1099/ijs.0.010876-0.
- (3) Wainwright, M., Wickramasinghe, N.C., Narlikar, J.V. and Rajaratnam, P. Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km, *FEMS Microbiol. Lett.*, 218, (2003) 161-165.
- (4) Imshenetsky, A.A., Lysenko, S.V., Kazakov, G.A. and Ramkova, N.V. On micro-organisms of the stratosphere, *Life Sci. Space Res.*, 14, (1976) 359-362.
- (5) Yang, Y., Itahashi, S., Yokobori, S. and Yamagishi, A. UV-resistant bacteria isolated from upper troposphere and lower stratosphere, *Biol. Sci. Space*, 22, (2008) 18-25.
- (6) Griffin, D.W. Terrestrial microorganisms at an altitude of 20,000 m in Earth's atmosphere, *Aerobiologia*, 20, (2005) 135-140.
- (7) Marple, V.A., and Willeke, K., Impactor Design, *Atmospheric Environment*, 10, (1976) 891-896.
- (8) Yamato, M. and Ono A., Chemical and Physical Properties of Stratospheric Aerosol Particles in the Vicinity of Tropopause Folding, *Meteorological Society of Japan*, Vol. 67, No. 1 (1989) 147-165.